

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-509729

(43) 公表日 平成11年(1999) 8月31日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
A 6 1 K 35/30	A E D	A 6 1 K 35/30	A E D
48/00	A A B	48/00	A A B
C 1 2 N 5/06		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	Y
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平9-505303  
(86) (22) 出願日 平成8年(1996) 7月5日  
(85) 翻訳文提出日 平成10年(1998) 1月6日  
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 6 / 1 1 3 0 4  
(87) 国際公開番号 W O 9 7 / 0 2 0 4 9  
(87) 国際公開日 平成9年(1997) 1月23日  
(31) 優先権主張番号 0 8 / 4 9 9 , 0 9 3  
(32) 優先日 1995年7月6日  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)  
(81) 指定国 E P (A T , B E , C H , D E ,  
D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L  
U , M C , N L , P T , S E ) , A U , C A , J P

(71) 出願人 エモリー ユニバーシティ  
アメリカ合衆国 ジョージア 30322, ア  
トランタ, リッジウッド ドライブ 2009  
(72) 発明者 ラスキン, マーラ ビー,  
アメリカ合衆国 ジョージア 30033, デ  
カトゥール, ハンプトン グレン コート  
1469  
(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

(54) 【発明の名称】 ニューロン始原細胞およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、約90%を超える哺乳類の腫瘍由来でないニューロン始原細胞（これはニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る）を含む、単離された細胞組成物を提供する。この細胞組成物を用いてニューロン疾患を処置する方法もまた提供される。

**【特許請求の範囲】**

1. ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る、約90%より多くの哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞を含む、単離された細胞組成物。
2. 前記哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞の約95%より多くが、ニューロンマーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る、請求項1に記載の組成物。
3. 前記単離されたニューロン始原細胞が、最初に不死化されずに、少なくとも2世代にわたって分化し得る、請求項1に記載の組成物。
4. 前記ニューロン始原細胞がラットの細胞である、請求項1に記載の組成物。
5. 前記ニューロン始原細胞がヒトの細胞である、請求項1に記載の組成物。
6. ニューロン始原細胞またはそれらの子孫の集団の少なくとも一部が、外因性核酸でトランスフェクトされる、請求項1に記載の組成物。
7. 前記外因性核酸が生物学的に活性な分子を機能的にコードする、請求項6に記載の組成物。
8. 前記外因性核酸が、細胞分裂または分化を刺激する生物学的に活性な分子を機能的にコードする、請求項7に記載の組成物。
9. 前記外因性核酸が、神経伝達物質の合成において機能する生物学的に活性な分子を機能的にコードする、請求項7に記載の組成物。
10. 請求項1に記載の細胞組成物のニューロン始原細胞またはそれらの子孫、またはそれらの混合物によって産生される生物学的に活性な分子を、哺乳動物の脳の領域へ送達する方法であって、請求項1に記載の細胞組成物を該脳の該領域に移植し、それにより該細胞またはそれらの子孫によって産生される生物学的に活性な分子を該領域に送達する工程を包含する、方法。
11. 請求項7に記載の細胞組成物のニューロン始原細胞またはそれらの子孫、またはそれらの混合物によって産生される生物学的に活性な分子を、哺乳動物の脳の領域へ送達する方法であって、請求項7に記載の細胞組成物を該脳の該領域に移植し、それにより該細胞またはそれらの子孫によって産生される該生物学的

に活性な分子を該領域に送達する工程を包含する、方法。

12. 哺乳動物の脳におけるカテコールアミンの減少により特徴付けられる神経障害を処置する方法であって、請求項1に記載の細胞組成物またはそれらの子孫、またはそれらの混合物を該脳に移植し、それによりカテコールアミンの供給源を該脳に提供し、そして該障害を処置する工程を包含する、方法。

13. 前記神経障害が、パーキンソン病である、請求項12に記載の方法。

14. 被験体のアルツハイマー病を処置する方法であって、該被験体の脳へ請求項8に記載の細胞組成物またはそれらの子孫、またはそれらの混合物を移植し、それによりアルツハイマー病を処置する工程を包含する、方法。

15. 被験体のアルツハイマー病を処置する方法であって、該被験体の脳へ請求項9に記載の細胞組成物またはそれらの子孫、またはそれらの混合物を移植し、それによりアルツハイマー病を処置する工程を包含する、方法。

16. 哺乳動物の脳における $\gamma$ -アミノ酪酸の減少により特徴付けられる神経障害を処置する方法であって、請求項1に記載の細胞組成物またはそれらの子孫、

またはそれらの混合物を該脳に移植し、それにより $\gamma$ -アミノ酪酸の供給源を該脳に提供し、そして該障害を処置する工程を包含する、方法。

17. 前記神経障害がハンティングトン病である、請求項16に記載の方法。

18. ニューロン細胞のマーカーをスクリーニングする方法であって、請求項1に記載のニューロン始原細胞を得る工程、および非ニューロン細胞中には存在しない、ニューロン始原細胞中のマーカーの存在を検出する工程を包含し、ここで、該非ニューロン細胞中には存在しない、該ニューロン始原細胞中に存在する該マーカーが、ニューロン細胞のマーカーである、方法。

19. ニューロン発現遺伝子を検出する方法であって、請求項1に記載のニューロン始原細胞からcDNAライブラリーを得る工程、非ニューロン細胞からcDNAライブラリーを得る工程、非ニューロン細胞におけるよりも、該ニューロン始原細胞からの該ライブラリーにおけるより高いレベルのcDNAの存在を測定する工程を包含し、ここで、該ニューロン始原細胞からの該ライブラリーにおけるより高いレベルのcDNAの存在が、ニューロン発現遺伝子を示す、方法。

20. ニューロンマーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る、約90%より多くの哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞を含む単離された細胞組成物を得る方法であって、新生児ラット脳の脳室を囲む領域の最前方範囲の背外側部分における脳室下帯前部と等価である哺乳動物の脳の部分から細胞を単離する工程、および該単離された細胞を有糸分裂インヒビターの非存在下で培養する工程を包含する、方法。

21. ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じる、約50%より多くの哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞を含む、単離された細胞組成物。

## 【発明の詳細な説明】

### ニューロン始原細胞およびその使用

本発明は、国立衛生研究所によって与えられたNIH補助金番号NS28380の下での政府援助で成された。政府は本発明に一定の権利を有する。

### 発明の背景

#### 発明の分野

本発明は、哺乳類ニューロン始原細胞の実質的に均一な集団を含む単離された細胞組成物に関する。さらに、本発明は、この細胞組成物を脳に移植することによって哺乳類の脳に生物学的に活性な分子を送達する方法に関する。

#### 背景技術

哺乳類のニューロンは成熟すると通常分裂することができないため、分裂性ニューロン細胞の供給源が探求されてきた。しかし、ニューロンを生じる分裂性細胞の供給源を同定することにはいくつかの困難があった。なぜならニューロン始原細胞は、ニューロンマーカーを発現しないことが頻繁にあるからであり、そして不均一な細胞集団（ニューロン細胞および非ニューロン細胞を含む）が通常生じ、かつ個々の始原細胞がニューロン細胞および非ニューロン細胞を発生させ得るからである。

新生物細胞株および不死化神経前駆体が、比較的均一な細胞集団を提供するために使用されてきた。これらの細胞は迅速に分裂するので、これらは通常、ニューロン表現型を有する細胞へと完全に分化する能力が制限されていることを示す。例えば、クロム親和性細胞腫由来のPC12細胞は、神経成長因子(NGF)の不存在下での培養において、分化しないかあるいは分化状態を維持しない。(GreenおよびTischler、Advances in Cellular Neurobiology、S.FederoffおよびL.Herts編(Academic Press, N.Y.)、(1982)。加えて、これらの細胞は、腫瘍由来であり、そして新生物特性を有する。さらに、多くの不死化神経前駆体細胞株は不均一な

細胞集団を生じる。

同様に、胚性がん腫細胞株は特殊な条件下での培養中で分化する。奇形がん腫

由来のNT2細胞は、親細胞をレチノイン酸で長期間処理した後のみ、培養で分化する細胞を生じる。しかし、NT2細胞はニューロン細胞および非ニューロン細胞の両方のタイプに分化する。得られる混合培養物は、有糸分裂インヒビターで処理されなければならない、そして次に、分裂性の非ニューロン細胞を除去し、そして比較的純粋なニューロン細胞集団に近づくために、細胞は再播種されなければならない（米国特許第5,175,103号）。これらの比較的純粋なニューロン細胞は、それでもなお腫瘍由来であり、そして新生物特性を有する。

成体および新生児の哺乳類の神経系からのニューロン前駆体の供給源は一般に、不均一性という同様の問題へと帰着した。ReynoldsおよびWeiss、Science 255:1707(1992)は、おそらく脳室下帯(subventricular zone)の部分を含む、成体の線条体由来の細胞を培養した。この細胞は上皮増殖因子(EGF)の存在下で培養され、そして大きな細胞クラスターを形成することができ、これを「ニューロスフェア」と名付けた。次にこのスフェアを解離し、そしてEGFの存在下で細胞を培養した。得られる細胞培養物は、分裂後のニューロン、グリア、および上衣下細胞の混合物からなる。従って、これらの手段によって、新しく発生した細胞のうちのいくつかはニューロンへの分化が誘導された。しかし、この方法によって得られるニューロンの割合は低い。他の研究者は、繊維芽細胞増殖因子を投与することによって、新生児の終脳の培養物からいくらかのニューロン増殖を誘導することができた。ReynoldsおよびWeissの方法のように、この新生児の供給源もまた、非ニューロン細胞と比較してニューロンの割合が低い結果となった。比較的純粋なニューロン細胞集団は、有糸分裂インヒビターによる処理の後でのみ、これらの方法で達成され得る。従って、この比較的純粋なニューロン細胞は分裂後の細胞である。

脳室下帯は、神経系における特定の分裂性細胞の供給源であることが知られている。しかし、脳室下帯は、主としてニューロンではなくグリアの供給源であると見なされている(Patersonら、J.Comp.Neurol.、149:83、1973; LevineおよびGoldman、J.Neurosci、8:3992、1988; LevisonおよびGoldman、Neuron 10:201(1993))。これは、インタクトなインビボの脳室下帯に関する統一見解である。しか

し、Luskin(Neuron、11:173(1993))は、インタクトな脳室下帯のある区別された領域が、インビボで嗅球ニューロンに分化する多くのニューロンを生じることを発見した。それでもやはり、新生児の脳室下帯由来の細胞を培養した他の研究者らは、これらの細胞の大部分が培養するとグリアとなることを示した(VaysseおよびGoldman、Neuron、4:833、1990; Lubetzkiら、Glia、6:289、1992)。LoisおよびAlvarez-Buylla、Proc.Natl.Acad.Sci.、90:2074、(1993)は、成体哺乳類の前脳からの脳室下帯の外植片を培養し、多くのニューロンを見出したが、それでもグリアが優勢であった。

従って、高割合のニューロン始原細胞とそれに相応して低割合の非ニューロン細胞とを有する細胞組成物を得るための、単純な手段が必要とされる。このような組成物およびこの組成物を達成するための手段は、従来の組成物および方法と比べていくつかの利点を提供する。例えば、精製されたニューロン集団を得るために必要とされる時間が短縮される。分裂性細胞が遺伝子移動を通じて操作され得る。さらに、分化しそして最終的には分裂を停止するニューロン細胞は、宿主神経系中に移植したとき、腫瘍形成の可能性を低減する。グリアは、ニューロンとは対照的に、特定のシグナルを与えると高度に増殖的であり得、そして神経膠腫を形成しさえし得る。新生物細胞株は同様に腫瘍を形成する結果となり得る。

培養された終脳脳室下帯からはグリアのみが生じること、または特定の好適な条件下でほんの低割合のニューロンを得ることができることを支持する上記研究とは対照的に、本発明は、哺乳類の腫瘍由来でないニューロン始原細胞（これはニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る）の実質的に均一な集団から構成される、単離された細胞組成物を提供する。これらの細胞が分裂する能力は典型的ではない。なぜなら、ほとんど例外なしに、ニューロン特異的細胞マーカーを発現するほとんどの細胞が分裂後の細胞であるからである。また、本発明の組成物は、約90%より多く、そして好ましくは約95%より多くのニューロン始原細胞が、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得るような、均一性の単離された細胞集団を含む。

## 発明の要旨

本発明は、約90%より多く、そして好ましくは約95%より多くの哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞を含む、単離された細胞組成物を提供する。このニューロン始原細胞は、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る。

本発明はさらに、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る、約90%より多くの哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞を含む細胞組成物のニューロン始原細胞またはそれらの子孫、またはそれらの混合物によって産生される生物学的に活性な分子を、哺乳動物の脳の領域に送達する方法であって、脳の領域へ細胞組成物を移植し、それにより、これらの細胞またはそれらの子孫によって産生される生物学的に活性な分子を領域に送達する工程を包含する、方法を提供する。

さらに、本発明は、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得、かつ生物学的に活性な分子を機能的にコードする外因性核酸でトランスフェクトされる、約90%より多くの哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞を含む細胞組成物のニューロン始原細胞またはそれらの子孫、またはそれらの混合物によって産生される生物学的に活性な分子を、哺乳動物の脳の領域に送達する方法であって、細胞組成物を脳の領域に移植し、それによりその細胞またはそれらの子孫によって産生される生物学的に活性な分子をその領域に送達する工程を包含する、方法を提供する。

本発明はさらに、哺乳動物の脳におけるカテコールアミンの減少により特徴付けられる神経障害を処置する方法であって、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る、約90%より多くの哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞またはそれらの子孫、またはそれらの混合物を含む細胞組成物を脳に移植し、それによりカテコールアミンの供給源を脳に提供し、そしてこの障害を処置する工程を包含する、方法を提供する。

本発明はまた、被験体のアルツハイマー病を処置する方法であって、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得、かつ細胞分裂または分化を刺激し、神経の生存を促進し、または神経伝達物質の合

成において機能する生物学的に活性な分子を機能的にコードする外因性核酸でトランスフェクトされる、約90%より多くの哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞またはそれらの子孫、またはそれらの混合物を含む細胞組成物を、被験体の脳へ移植し、それによりアルツハイマー病を処置する工程を包含する、方法を提供する。

本発明はさらに、哺乳動物の脳における $\gamma$ -アミノ酪酸の減少により特徴付けられる神経障害を処置する方法であって、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る、約90%より多くの哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞またはそれらの子孫、またはそれらの混合物を含む細胞組成物を脳に移植し、それにより $\gamma$ -アミノ酪酸の供給源をこの脳に提供し、そしてその障害を処置する工程を包含する、方法を提供する。

また本発明により、ニューロン細胞のマーカーをスクリーニングする方法であって、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る、約90%より多くの哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞を得る工程、および非ニューロン細胞中には存在しない、ニューロン始原細胞中のマーカーの存在を検出する工程を包含し、ここで、非ニューロン細胞中には存在しない、ニューロン始原細胞中に存在するマーカーが、ニューロン細胞のマーカーである、方法が提供される。

本発明はまた、ニューロン発現遺伝子を検出する方法であって、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る、約90%より多くの哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞を含む細胞組成物のニューロン始原細胞からcDNAライブラリーを得る工程、および非ニューロン細胞からcDNAライブラリーを得る工程、非ニューロン細胞におけるよりも、ニューロン始原細胞からのライブラリーにおけるより高いレベルのcDNAの存在を決定する工程を包含し、ここで、ニューロン始原細胞からのライブラリーにおけるより高いレベルのcDNAの存在が、ニューロン発現遺伝子を示す、方法を提供する。

本発明はさらに、ニューロンマーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る、約90%より多くの哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞を含む単離された細胞組成物を得る方法であって、新生児ラット脳の脳室

を囲む領域の最前方範囲の背外側部分における脳室下帯前部と等価である哺乳動物の脳の部分から細胞を単離する工程、および単離された細胞を有糸分裂インヒビターの非存在下で培養する工程を包含する、方法を提供する。

本発明はまた、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じる、約50%より多くの哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞を含む、単離された細胞組成物を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、同所性(homotopic)移植手順を示す。(A)は、矢状方向に切開された新生児(P0-P2)前脳から顕微解剖された、側脳室の前外側部分とそれに覆い被さる脳梁との間に位置するSVZaを示す。(B)は、SVZaのニューロン始原細胞を含む組織片を示す。これは一緒に採取され、トリプシン処理され、洗浄され、そして粉砕によって機械的に単一の細胞または小さな凝集塊に解離された。(C)細胞懸濁液を示す。これは注意深く洗浄され、生存度について評価され、次に、宿主の脳中の移植されたSVZa細胞の明確な同定を確実にするために蛍光性の親油性色素PKH26またはBrdUで標識された。(D)は、宿主脳のSVZa内に定位的に配置される、解離されたPKH26標識SVZa細胞を示す。

図2は、P0-P2のSVZaニューロン始原細胞を新生児の線条体内に移植するための異所性(heterotopic)移植手順を示す。(A)は、SVZaの位置(黒色領域)を示した、新生児ラット前脳の傍矢状切開の例図を示す。SVZaは、マイクロナイフを用いてP0-P2ラット前脳から顕微解剖された。(B)は、個々の組織片を示す。これはエッペンドルフ(Eppendorf)チューブ中に採取され、そしてSVZa細胞の単一細胞懸濁液を得るために先端熱加工されたパスツールピペットを用いて解離される。(C)は、親油性赤色蛍光色素PKH26で標識されたSVZa細胞懸濁液を示す。(SVZa細胞を細胞増殖マーカーBrdUで標識するために、P0-P2の仔にBrdUを腹腔内注射した。1日後、SVZaを切除し、そして解離して細胞懸濁液とした)。(D)は、P0-P2で線条体(ST)内に定位移植される標識SVZa細胞懸濁液を示す。C(脳梁)；CTX(大脳皮質)；D(背面)；LV(側脳室)；OB(嗅球)；P(後ろ)。縮尺目盛り(A)=2mm、(D)にも適用。

## 発明の詳細な説明

本発明は、以下の特定の実施態様の詳細な説明およびそこに含まれる実施例を参照することによって、より容易に理解され得る。

本発明は、約90%より多くの哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞を含む、単離された細胞組成物を提供する。この始原細胞は、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る。この組成物の、好ましくは少なくとも約95%、そしてより好ましくは約98%より多くが、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る、哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞である。請求の範囲において使用される場合、「単離された」とは、哺乳動物の脳から取り出されたことを意味する。本明細書中に記載されるように、哺乳動物の脳から単離された前脳室下帯(SVZa)の領域が、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る、約90%より多いニューロン始原細胞の細胞組成物を提供することが、本明細書中に示される。例えば、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る、約50、60、70、80、または85%のニューロン始原細胞を有する組成物がまた得られ得る。好ましくは約95%より多く、またはさらにより好ましくは約98%より多くのこの組成物中の細胞が、ニューロン特異的マーカーを発現し、そしてニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得るニューロン始原細胞である。特に、単離の時点で、組成物中の細胞の約98~100%が、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得るニューロン始原細胞であり得る。従って、本発明は、ニューロン始原細胞の実質的に均一な組成物を提供する。

本明細書中で使用される場合、「ニューロン細胞」または「ニューロン」は、有糸分裂後であり、そして1以上のニューロン特異的マーカーを発現する細胞を含む。このようなマーカーの例は、ニューロフィラメント、微小管結合タンパク質2、およびtau、ならびに好ましくはニューロン特異的クラスIII $\beta$ チューブリンおよびneu Nを含み得るが、これらに限定されない。本明細書中で使用される場合、「ニューロン始原細胞」は、ニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得るが、ニューロン細胞とは異なり、インビボまたはインビトロで細胞分裂し得、そしてま

た

有糸分裂後のニューロンと同様に、ニューロン特異的マーカーを発現する細胞である。

これらの組成物において、好ましくはわずかに約10%、またはより好ましくは約5%、またはさらにより好ましくは約2%以下の組成物中の細胞が、非ニューロン細胞である。非ニューロン細胞には、グリア特異的マーカー、例えば、グリア原線維酸性タンパク質(GFAP)を発現するか、またはいかなるニューロン特異的マーカーも発現しない細胞が含まれる。非ニューロン細胞には、グリア細胞、上皮細胞、マイクログリア、および線維芽細胞が含まれ得るが、これらに限定されず、そしてニューロン始原細胞は含まれない。

本明細書中で使用される場合、細胞の「子孫」には、その細胞の任意の後続の世代が含まれ得る。従って、ニューロン始原細胞の子孫には、例えば、より後の世代のニューロン始原細胞、分化を経たより後の世代の細胞、または完全に分化した、有糸分裂後のニューロン細胞が含まれ得る。

本明細書および添付の請求の範囲において使用される場合、単数形(「a」、「an」および「the」)には、文脈が明らかに別のことを示さない限り、複数のものも含むことに注意せねばならない。

本発明は、ニューロン特異的マーカーを発現し、そして分裂し得る、哺乳動物の腫瘍由来でない細胞を含む細胞組成物を提供する。この細胞組成物は、本明細書中でさらに記述され、そして以下の実施例において例示されるように、ラット脳の脳室下帯前部(本明細書中では、互換可能に、「SVZa」と呼ばれる)領域に対応する領域から単離され得る。実質的に均一な組成物は、有糸分裂インヒビターでの処理を行わずに得られ得る。さらに、この細胞が分裂する能力は、不死化技術を使用することなく達成され得る。ニューロン始原細胞は、最初に不死化されることなく、少なくとも2世代の間分裂し得る。少なくとも約2世代、好ましくは少なくとも約5世代、そしてより好ましくは少なくとも約10世代またはそれ以上の世代のニューロンの分裂は、単離された細胞が、以下の実施例において例示されるような標準的な培養条件下に置かれる場合に生じ得る。

さらに、ニューロン始原細胞の実質的に均一な組成物の細胞は、ニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る。従って、この組成物の使用により、有糸分裂イ

ンヒビターの非存在下で、90%より多く、そして好ましくは95%より多く、そしてより好ましくは98%より多くの以下の細胞のいずれかを含む組成物が得られ得る：ニューロン始原細胞、ニューロン始原細胞の子孫およびニューロン細胞。

本明細書中に記載される組成物に含まれる細胞は、目的の任意の哺乳動物の脳のSVZaから単離され得る。例えば、細胞は、マウス、ラット、ブタ、サルおよびヒトから得られ得る。好ましい供給源は、生後のラット、ブタおよびマウスならびに胎児期のサルおよびヒトの脳であり得るが、多くの他の供給源が当業者には明らかである。ラットのSVZaは、脳室の周囲の脳室下帯の最前方範囲の背外側部分である。これは線条体に対して前方かつ背側である。これは異なる外見を有し、そして周囲の構造より白色である。さらに、これは、おそらくこの領域中の細胞密度のために、上に横たわる脳梁より不透明である。他の哺乳動物、例えば、ヒト、サル、およびマウスにおいて、対応する領域は、脳内のこの位置(location)およびこれらの物理学的特徴の両方によって位置決めされ得る。

本発明は、少なくとも一部の細胞が選択された核酸によりトランスフェクトされている細胞組成物を提供する。細胞は、下記の実施例において例示される外因性核酸を用いてトランスフェクトされ得る。「外因性」には、その細胞中に元来見出されないいかなる核酸をも含み得、改変前にはその細胞にとって元々内因性である改変された核酸を含む。「トランスフェクトされた」とは、核酸を移入し得る任意の手段、例えば、感染、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、塩化カルシウム沈澱またはリポソーム媒介移入を含むことを意味する。これらの移入方法は、一般に、当該分野において標準的である(例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York(1989)を参照)。好ましくは少なくとも約3%、より好ましくは約10%、より好ましくは約20%、より好ましくは約30%、より好ましくは約50%、そしてさらにより好ましくは約75%の細胞は、トランスフェクション手順が行われた後少なくとも

最初に、首尾良くトランスフェクトされる。トランスフェクトされる細胞の割合を増大させるために、多重トランスフェクションが実施され得る。例えば、細胞を選択されたベクターで感染させ、感染後に培地を取り除き、再感染などさせ、

そして感染した細胞の所望の割合が達成されるまでこのプロセスを繰り返し得る。いくつかのウイルスは、例えば、37℃のインキュベーション温度にて約2時間生存可能であり得、従って、感染は、トランスフェクト細胞のより高い割合を達成するために、好ましくは、2時間ごとに繰り返され得る。トランスフェクト細胞数を増加させる他の方法、例えば、一過性トランスフェクション(Pear, W.S. ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:8392-8396(1993))は、当該分野において、公知であり、そして標準的である。

任意の選択された核酸が細胞中に移入され得る。例えば、生物学的に活性な分子を機能的にコードする核酸が、細胞中に移入され得る。好ましい核酸には、例えば、細胞分裂もしくは分化を刺激するかまたはニューロンの生存を促進する生物学的に活性な分子、例えば、成長因子(例えば、神経成長因子(NGF))、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン(NT)-3およびNT-4/5、毛様体栄養因子(GNTF)、および成長インヒビターをブロックする因子などをコードする核酸が含まれ得る。さらに、好ましい核酸には、神経伝達物質、例えば、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)およびグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)の合成において機能する生物学的に活性な分子をコードする核酸が含まれ得る。核酸は、選択された任意のベクター、例えば、プラスミドまたはウイルスベクター中に存在し得、そしてこれに応じて、細胞中への移入方法が選択され得る。当該分野において公知のように、核酸は、特定の発現のために、例えば、特定の細胞特異的もしくは組織特異的プロモーターを使用することによって、容易に誘導され得るプロモーターを使用することによって、または、所望であれば、特に強力なプロモーターを選択することによって、改変され得る。

本発明はまた、細胞組成物を単離する方法を提供する。従って、特別の培養条件または有糸分裂インヒビターでの処理がなくても実質的に均一な組成物を単離する方法、およびニューロン始原細胞またはそれらの子孫の少なくとも一部を外

因性DNAでトランスフェクトする方法が提供される。特に、本発明は、組成物の細胞の約90%より多く、および好ましくは約95%より多く、およびさらに好ましくは約98%より多くが、ニューロンマーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る、腫瘍由来でないニューロン始原細胞である、単離され

た細胞組成物を得る方法を提供する。ここで、この方法は、哺乳動物脳の脳室下帯前部 (SVZa) から細胞を単離する工程、および有糸分裂インヒビターの非存在下で細胞を培養する工程を包含する。上述のように、このような細胞の供給源は、好ましくは、生後のラット、ブタ、またはマウスの脳、および胎児期のサルまたはヒトの脳であり得る。細胞は、本明細書中に記載し、かつ実施例において例示されるように、選択された哺乳動物のSVZaから単離される。SVZaは、その位置 (本明細書中に記載および例示) およびその物理的特性 (本明細書中に記載および例示) の両方によって位置決めされる。細胞は、次いで、有糸分裂インヒビターの非存在下で培養され得る。従って、単離された細胞組成物は、グリア細胞および他の非ニューロン細胞が実質的に存在しない (すなわち、10%未満、好ましくは5%未満、より好ましくは2%未満しか含まない) ものであり得、従って、組成物から非ニューロン細胞を除去するように設計された培養条件がしばしば省略され得る。従って、培養細胞は、例えば、有糸分裂インヒビターに供する必要がない。しかし、所望であれば、有糸分裂インヒビターが利用され得る。さらに、単離された細胞は、その集団の少なくとも一部がトランスフェクトされるように、外因性核酸でトランスフェクトされ得る。さらに、単離された細胞組成物の細胞は、標準的な方法 (例えば、形質転換) により不死化されて、細胞株を作出し得る (例えば、Gage, F.H.ら, *Annu. Rev. Neurosci.* 18:159(1995))。

本発明はまた、組成物のニューロン始原細胞またはそれらの子孫により産生される生物学的に活性な分子を、細胞組成物の移植により、脳の領域に送達する方法を提供する。特に、本発明は、組成物のニューロン始原細胞またはそれらの子孫、または上記のそれらの混合物 (この組成物は、約90%より多く、および好ましくは約95%より多く、およびさらに好ましくは約98%より多くが、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る、哺

乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞である単離された細胞組成物を含む)により産生された生物学的に活性な分子を哺乳動物の脳の領域に送達する方法であって、細胞組成物を脳の領域に移植し、それにより細胞において産生される生物学的に活性な分子をその領域に送達する工程を包含する方法を提供する。組成物のニューロン始原細胞またはそれらの子孫、またはそれらの混合物は、あ

らかじめ培養するかまたはその後培養することなく、宿主脳に移植され得る。培養は、好ましくは、本明細書中に例示および当該分野で公知のように、ニューロン細胞に関する標準的な方法に従って、または成長因子と共に規定の培地において実施され得る。細胞は、あらゆる所望の長さの時間にわたって培養され得る。例えば、細胞は、数日間培養され得、このことは細胞数を増大し得る。例えば、ニューロン始原細胞は移植前に少なくとも1倍、より好ましくは2倍、5倍、または10倍またはそれ以上に分裂させ得る。さらに、分化前に移植された細胞は、移植後インビボで分裂し得る。さらに、移植のための細胞は外因性核酸でトランスフェクトされ得、そしてこの細胞は、移植前に、外因性核酸での数回のトランスフェクションに供し得る。

移植は、移植された細胞により通常産生される生物学的に活性な分子（すなわち、内因的にコードされた産物）を宿主脳に送達する目的、またはトランスフェクトされた細胞（次いで、移植される）において外因的に導入されたDNAから生じる生物学的に活性な分子を宿主脳に送達する目的のために実施され得る。上述にも記載したように、用語「生物学的に活性な分子」は、合成酵素、神経伝達物質、推定神経伝達物質、神経栄養因子、および細胞分裂および／または分化のインヒビターをブロックし得る因子を包含するが、これらに限定されない。

移植は、当該分野で公知のように、例えば、細胞懸濁液の定位注入であり得、そしてこの注入は、同所または異所のいずれかの脳領域に行われ得る。移植は、本明細書中の実施例において例示されるように実施され得る（Dunnett, S.B.およびBjörklund, A.,編、Transplantation: Neural Transplantation-A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford(1992)）。例えば、細胞が緩衝溶液中に懸濁され得るか、あるいは細胞組成物を含有する全組織が移植され得る

。解離された細胞懸濁液は細胞分散および移植片の血管新生を最大化し得る。不十分な血管新生は、不十分な移植片生存における重要な因子である。所望であれば、細胞は移植前に標識され得る。多重移植は、移植が所望される移植細胞の数および移植細胞を受容する標的領域の面積に依存して実施され得る。移植細胞は、好ましくは、限定数の世代にわたって移植後インビボで分裂して、腫瘍形成を生じさせることなく、より大きな領域のニューロン始原細胞およびより多くの数の二

ニューロン始原細胞を生じさせ得る。さらに、移植細胞は、好ましくは、脳内でいくぶんか移動または分散し得、従ってこれらの細胞を受容するより大きな領域を作出し得る。さらに、移植細胞は、好ましくは、最終的に成熟ニューロンに分化し得る。

本発明は、生物学的に活性な分子の供給(provision)が処置され得る種々の神経障害または疾患を処置する方法を提供する。「処置する」とは、特定の障害または疾患のあらゆる徴候の改善をもたらすことを意味する。障害は、カテコールアミンの減少により特徴づけられる障害（例えば、パーキンソン病）、GABAの減少により特徴づけられる障害（例えば、特定の形態のてんかんおよびハンティングトン病）、または神経変性状態により特徴づけられる障害（例えば、アルツハイマー病）を包含するが、これらに限定されない。特定の障害／疾患を処置するために、組成物のトランスフェクト細胞または非トランスフェクト細胞またはそれらの子孫、またはそれらの混合物が、宿主脳に移植され得る。ここで、宿主脳は、神経障害を示している。移植は、脳に、移植細胞により産生される生物学的に活性な分子を提供する。この分子は、移植されたニューロン始原細胞またはそれらの子孫に対して内因性であるか、またはその分子をコードする核酸が、移植されるニューロン始原細胞またはそれらの子孫に移植前にトランスフェクトされていてよい。さらに、例えば、細胞は、生物学的に活性な分子の産生の増大をもたらすように、移植前に処理され得る。あるいは、細胞は、疾患を処置するための適切な成長因子の供給源として用いられ得る。関連して、細胞は、新規な成長因子をスクリーニングするために用いられ得る。この成長因子は、続いて治療

能についてスクリーニングされ得る。

従って、1つの実施態様では、細胞は、被験体の特定の疾患を処置する特定の生物学的に活性な分子を提供する移植について選択され得る。例えば、カテコールアミンの減少により特徴づけられる障害（例えば、パーキンソン病(PD)）を有する被験体について、単離されたニューロン始原細胞またはそれらの子孫、またはそれらの混合物（上述のような）を含有する実質的に均一な組成物が、例えば、PDのために、線条体の領域に移植され得る。移植細胞は、必ずしも外因性核酸でトランスフェクトされる必要はない。なぜなら、これら細胞の少なくとも一部が

カテコールアミン、特にドパミンを産生し得るからである。しかし、所望であれば、細胞は、移植前に、外因性核酸でトランスフェクトされ得る。例えば、通常より高いレベルの所望の生物学的に活性な分子を産生する酵素をコードする組換え核酸が、所望であれば利用され得る。細胞の他の望ましい操作は、本明細書中の教示を考慮すれば、実施者に明らかである。

別の例は、GABAの減少により特徴づけられる障害（例えば、特定の形態のてんかん (Merritt's Textbook of Neurology, 第9版(L.P.Rowland編、Williams and Wilkins, Baltimore, 1995))、およびハンティングトン病(HD)(Martin, J.B. およびGusella, J.F.,Huntington's Disease: Pathogenesis and Management, New Eng. J. Med. 315:1267-1276(1986))を有する被験体の処置である。これらの被験体は、組成物の細胞またはそれらの子孫、またはそれらの混合物（上述のような）の脳（例えば、大脳皮質および線条体のような領域）への移植により処置され得る。これらの細胞は、必ずしも外因性核酸でトランスフェクトされる必要はない。なぜなら、これら細胞のかなりの部分がGABAを産生し得るからである。しかし、所望であれば、細胞は、外因性核酸でトランスフェクトされ得る。例えば、通常より高いレベルの産物を産生する酵素をコードする組換え核酸が、所望であれば利用され得る。細胞の他の望ましい操作は、本明細書中の教示を考慮すれば、実施者に明らかである。細胞は、例えば、てんかんについては海馬および／または大脳皮質、およびハンティングトン病については線条体のような領域に

移植され得る。

処置の別の例は、神経変性状態（例えば、アルツハイマー病（R.D.Terry, R. KatzmanおよびK.L.Bick, Alzheimer's Disease, Raven Press, NY(1994)）である。変性の量を減少させるように、例えば、細胞分裂または分化を刺激する生物学的に活性な分子またはニューロン生存を促進する生物学的に活性な分子（例えば成長因子（例えば、神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン(NT)-3およびNT-4/5、およびCNTF）、または成長インヒビターをブロックする因子）をコードする核酸をトランスフェクトした細胞を含有する本明細書中に記載の細胞組成物は、被験体の脳（例えば、基底前脳、海馬、および／または大脳皮質のような領域）に移植され得る。細胞の他の望ましい操作は、本

明細書中の教示を考慮すれば、実施者に明らかである。細胞はまた、至適な治療効果のために種々の成長因子と併用して用いられ得る。関連して、細胞はまた、動物モデルにおける治療価について因子をスクリーニングするために種々の成長因子と共に投与され得る。

本発明はまた、ニューロン細胞のマーカーについてスクリーニングする方法を提供する。具体的には、本発明は、ニューロン細胞のマーカーについてスクリーニングする方法を提供し、この方法は、本明細書中で記載する細胞組成物（この組成物は、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る、約90%、もしくは95%、または99%よりも多くのニューロン始原細胞を含む）を得る工程、非ニューロン細胞、またはこれらの細胞のマーカーに関する情報を得る工程、および非ニューロン細胞には存在しない、細胞組成物中のマーカーの存在を検出する工程を包含する。細胞組成物中に存在する、非ニューロン細胞には存在しないマーカーは、ニューロン細胞のマーカーである。したがって、細胞組成物のマーカーは、非ニューロン細胞のマーカーと比較され得、ニューロンにおいて排他的に存在するか、またはより大きな割合で存在するマーカーが同定され得る。ニューロン特異的マーカーは、神経疾患のための診断技術および治療技術に有用であり得る。

さらに、本発明はニューロン発現遺伝子を検出する方法を提供し、この方法は

、本明細書中に記載される細胞組成物（この組成物は、約90%より多く、好ましくは約95%より多く、そしてより好ましくは約98%より多くの哺乳動物の腫瘍由来でないニューロン始原細胞（これは、ニューロン特異的マーカーを発現し、かつニューロン細胞に分化し得る子孫を生じ得る）を含む組成物）からcDNAライブラリーを得る工程、非ニューロン細胞からのcDNAライブラリーを得る工程、非ニューロン細胞におけるよりも、細胞組成物からのライブラリーにおいて高レベルのcDNAの存在を決定する工程を包含する。細胞組成物からのライブラリーにおけるより高レベルのcDNAの存在は、ニューロン発現遺伝子を示す。したがって、ニューロン組成物に由来するcDNAライブラリーは、非ニューロン細胞からのライブラリーに比較され得、ニューロン細胞において排他的に発現するか、またはより大きな割合で発現する遺伝子が同定され得る。このような比較に基づくスクリーニング

グを行う方法は、当該分野において公知であり、したがって本明細書中の教示を与えられた当業者により容易に行われ得る。ニューロン特異的マーカーは、神経疾患のための診断技術および治療技術に有用であり得る。

#### 本発明の利用性

哺乳動物ニューロンは、一般に、成熟すると分裂し得ないので、分裂するニューロン細胞の供給源が探求されてきた。本発明は、このような分裂する細胞の供給源を提供する。さらに、これらの細胞は、ニューロン細胞の特徴を示す。したがって、細胞組成物は、例えば、そのニューロンが変性しているかまたは正常な細胞分子を産生していない被験体に、ニューロン表現型を有する健常な細胞を、移植するための有用な組成物を提供する。次いで、移植された細胞は、脳に欠損分子（単数または複数）を提供し得る。例えば、本発明の組成物は、カテコールアミンの減少により特徴づけられるパーキンソン病（PD）を、PDを有する被験体の脳に本発明の細胞組成物を移植することにより処置するために特に有用であり得る。次いで、移植された細胞は、脳にカテコールアミンを提供し得る。本発明の組成物が有用であり得る別の例は、ハンティングトン病またはGABAの減少により特徴づけられる癲癇の形態を処置するにおいてである。なぜなら、これらの細

胞は移植された脳にGABAを提供し得るからである。さらにこの組成物は、任意の核酸の所望の産物を中枢神経系に提供することにおいて有用であり得る。任意の所望の核酸は、この組成物のニューロン始原細胞中にトランスフェクトされ得、そして中枢神経系に移植され得る。このような方法により処置され得る疾患の例は、アルツハイマー病 (AD) である。例えば、成長因子または神経栄養因子をコードする核酸を有する細胞は、AD患者の脳に注射され得、脳における変性を減少または予防し得る。

さらに、本発明の組成物は、ニューロン細胞のマーカーについてスクリーニングするために使用され得、そして新しいニューロン細胞をさらに特徴づけし、そして同定するために使用され得る。マーカーは、例えば、疾患状態を検出もしくは処置するために、または哺乳動物における脳室下帯前部を同定するために使用され得る。このような細胞はまた、ニューロン細胞に、肯定的にまたは有害に、

影響を与える組成物についてスクリーニングするために利用され得る。この様式において、ニューロン障害を処置するための化合物（例えば、新規な成長因子）がスクリーニングされ得、そしてニューロンに対して有害な化合物が決定され得る。神経疾患の診断および処置における多くの他の使用は、当業者に明らかである。本発明は、健常なニューロンおよび／または所望の遺伝子を発現するニューロンの供給が、神経疾患または障害のいくつかの影響を軽減し得る、任意の神経疾患または障害の治療学的処置に利用され得る。したがって、これは、本明細書中の教示を与えられた当業者には明らかであるように、広範な使用を有し得る。

細胞はまた、治療のためにまたは細胞分化における研究道具としての使用のためのニューロン成長因子を産生するために使用され得る。細胞自身もまた、細胞増殖および分化を研究するための研究道具として使用され得る。

本発明は、以下の実施例においてより詳細に記載される。これらの実施例は、それにおける多くの改変および変化が当業者には明らかであるので、例示としてのみ意図される。

実施例

実施例 1

SVZa細胞の顕微解剖および解離：新生ラット脳の傍矢状切片からSVZaを顕微解剖する方法を得た。SVZa細胞を採集するために、P 0 – P 1 Sprague-Dawley仔ラット(pups)を氷上で麻酔し、断頭し、それらの頭部を冷滅菌Ham's F-10培地(Sigma)中に入れた。頭蓋を取り除いた後、脳を新鮮な培地中に入れ、正中線(midline)において二分した。解剖顕微鏡の下で、約2mmの厚さの傍矢状切片を脳半球の正中線から取り、図1に示すようにSVZaを顕微解剖した。SVZaは、脳室を囲む領域の最前方範囲の背外側部分である。線条体に対して前方かつ背側にある。SVZaは、その脳室に対する位置、ならびにその色合いおよび組織で周囲構造と区別され得る。SVZaは白く、それを覆う脳梁と比べて細胞密度が高いため脳梁よりも不透明である。SVZaはまた、細胞密度のためにより密度が高く不均一に見える。新生ラットにおいて、SVZaは、ブレグマの約2.0mm前方、正中線の1.0mm外側、かつ軟膜表面から2.0mmの深さにある。

数匹(7-15)の仔ラットから得たSVZa組織の断片を、約5mlのハンクス平衡生理食塩溶液(HBSS)を含む滅菌試験管の中にプールした。断片を、0.1%トリプシンおよび0.01%DNase含有HBSSで37℃にて20分間インキュベートし、0.04%DNase含有HBSSを含む培地で洗浄した。最後の洗浄容量は、解剖組織1断片当たり $5\mu\text{l}$ に上げ、 $10^5$ - $10^6$ 細胞/mlを得た。単一細胞および小さいクランプに対して比較的均等な解剖を得るために、組織を徹底的に粉碎した。

移植または培養の前に、生存(緑)および死(赤)細胞の陽性識別をもたらす蛍光FDA/PI(フルオレセインジアセテート/プロピジウムヨウ化物)方法を用いて細胞生存度を決定した。新たに調製した細胞懸濁液からは、常に80-95%の生存度が得られた。

## 実施例2

インビトロ細胞標識：宿主脳に移植された細胞を可視化するために、親油性膜結合色素(PKH26)で細胞を標識し得る。この色素は、551nm励起および567nm発光で赤く蛍光し、移植直前に解離されたSVZa細胞を標識するために用いられ得る。SVZa細胞に関して、新たに解離した細胞の懸濁液を、PKH26( $4\mu\text{M}$ 色素含有希釈液C、Sigma)で3-5分間標識した。実質的に全ての細胞が、強度に標識される。

いくつかの実験において、BrdU(5 mg BrdU/ml 0.007N NaOH含有0.9% NaCl)(細胞増殖マーカー)を、解離されたSVZa細胞を移植前に標識するために用いた。この標識方法を用いて、MenezesおよびLuskin、J.Neurosci、14:5399(1994)に記載の手順に従って、移植後の分裂細胞を可視化し得る。詳細には、ブロモデオキシウリジン(BrdU)を、培養培地に加え、次いで、1～24時間後に培養物を上記したように固定し、BrdUに対する抗体で染色して標識された細胞の存在を明らかにした。固定後、培養物を、0.01M PBSで洗浄し、60℃にて2N HClで処理してDNAを断片化し、続いて、0.01Mホウ酸緩衝液(pH8.3)中で酸中和した。PBSでの徹底的な洗浄ならびにブロッキング血清(10%正常ヤギ血清および0.01% Triton X-100含有0.01M PBS)の適用後、培養物を、1:500希釈を用いてBrdUに対するモノクローナル抗体( $\alpha$ -BrdU、Accurate、NY)と4℃にて一晩インキュベートした。その後、培養物を、0.1M PBSでリンスし、1:200希釈でローダミン結合ヤギ抗ラット二次抗体(Jackson ImmunoResearch、PA)と室温にて1時間インキュベートし、0.1M PBS中で洗浄し、Vectashield(Vector、CA)を用いてカバーガラスをかけた。BrdU陽性細胞は、赤蛍光核を呈示する。

### 実施例 3

細胞培養：培養物中の単離されたSVZa細胞は、本質的に全てニューロンである。つまり、これらは、ニューロン特異的マーカーで染色された場合に免疫反応性を有する。採集し解離したSVZa細胞の表現型を確認するために、これらを被覆されていないガラス顕微鏡スライド、またはポリ-D-リジンまたはポリオルニチンで被覆されたガラススライド上に置き、10%ウシ胎児血清を補充したフルストレンジスHam's F10培地(Sigma)またはダルベッコ最小必須培地DMEM(Sigma)、または比率1:1のHam's F10培地:DMEMのいずれかで37℃にて7% CO<sub>2</sub>中で培養した。詳細には、解離に続いて、細胞を700rpmで7分間遠心分離し、ペレットを新しい培地で再分散し、血球計を用いて細胞数を概算した。約 $3.32 \times 10^3$ 細胞を、ガラスチャンバースライドの各ウェル(LabTek16ウェル)に加えた。あるいは、細胞を $3.3$ または $5.9 \times 10^3$ 細胞/cm<sup>2</sup>の密度でプレートした。各ウェルを10 $\mu$ g/mlのポリ-D-リジン(P-7280、Sigma)と37℃にて1時間インキュベーター中で被覆し、蒸留

水で3度リンスし、培養フード(culture hood)中で風乾した。あるいは、細胞を $10\mu\text{g/ml}$ のマウスラミニン(23017-015、Gibco)、 $500\mu\text{g/ml}$ ポリ-L-オルニチン(P-3655、Sigma)、または両方を組合わせたものの上にプレートした。

1～8日後、SVZa培養物を4%パラホルムアルデヒドおよび0.12Mスクロース含有0.1M PBS中で20分間固定し、冷PBS中でリンスし、100%エタノールに浸透させ、エタノール系列で再水和し、PBS中でリンスした。50mMグリシン中でのインキュベーション、および冷PBS中での3度のリンスの後、ブロッキング血清(0.5%正常ヤギ血清および0.01% Triton X-100含有0.1M PBS)を1時間適用した。マウスモノクローナル抗体TuJ1、すなわちクラスIII $\beta$ -チューブリンを認識するニューロン特異的抗体(Leeら、Proc. Natl. Acad. Sci. 87:7195(1990))；Dr. A. Frankfurter、(University of Virginia、Charlottesville、VA)から提供され

た)の1:500希釈液、および1:500希釈のグリア線維性酸性タンパク質に対するウサギポリクローナル抗体(GFAP；Dako)(Bignamiら、Brain Res.43:429(1972))と共に細胞を一晩インキュベートした。次いで、細胞を0.1M PBSでリンスし、フルオレセインヤギ抗マウス(Jackson、1:100)およびローダミンヤギ抗ウサギ(Jackson、1:200)を含む二次抗体の混合液中で1時間インキュベートし、0.1M PBS(pH7.4)中で洗浄し、Vectashield(Vector、CA)を用いてカバーガラスをかけ、エピ蛍光顕微鏡(epifluorescence microscopy)で試験した。

移植前の顕微解剖された細胞のアイデンティティを決定的に確認するために、細胞をプレートし、細胞型特異的マーカーについて染色し、それらを特徴づけた。細胞のアイデンティティの特徴づけは、解離された細胞の純度、および顕微解剖された細胞がグリアのための始原体を含むか否かを決定するために行った。上記したように、プレーティング前の解離細胞の生存度は非常に高く、80-95%の間にあり、しばしば95%を上回った。プレーティング後の最初の数時間内に、明視野顕微鏡および位相差顕微鏡によって観察すると、大半の細胞がガラス表面に接着し、一部はそれらの細胞体から1または2つの突起を伸長さえていた。これは、培養細胞のいくらかが、ほぼプレーティング直後に分化し始めたことを示す。TuJ1、すなわちニューロン特異的クラスIII $\beta$ -チューブリンを認識する抗体

(Leeら、Proc. Natl. Acad. Sci. 87:7195(1990))を、ニューロンの表現型を有する細胞を同定するために使用し、GFAPに対する抗体を、星状細胞、すなわち新生児脳室下帯の他の領域に通常由来する細胞型を区別するために使用した(Privat. Int.Rev.Cytol.、40:281(1975);LevisonおよびGoldman、Neuron 10:201(1993); LuskinおよびMcDermott、Glia、11:211(1994))。

インビトロにて1日後(1 DIV)、培養されたSVZa細胞の全てまたはほとんど全てをTuJ1で染色した。プレーティング後の最初の数時間内に、明視野顕微鏡および位相差顕微鏡によって観察すると、大半の細胞がガラススライド表面に接着しており、一部はそれらの細胞体から1または2つの突起を伸長さえていた。これは、プレートされた細胞のいくらかが、ほぼプレーティング直後に分化し始めたことを示す。

培養物中で24時間後、培養細胞の大部分が、2～4の細胞を含む小さいクラスター、あるいは双極または時折多極形態の個々の細胞として生じた。興味深いことに、群生した細胞および個々の細胞の圧倒的多数が、体細胞細胞質(somatic cytoplasm)および細胞突起において明らかなように、明確なTuJ1免疫反応性を示した。この段階において、培養物中にGFAP陽性細胞は滅多に見られなかった。この結果は、プレートされた細胞が、明白なニューロンのアイデンティティを有することを示した。この結果はまた、SVZaのみが解剖に含まれたことを示した。さもないと、GFAP陽性細胞があると考えられる。

また、細胞を、培養物中で8日間までの中間時点で染色し、どの程度の細胞が、排他的にニューロンの表現型を示すかを見分けた。8日目において、培養細胞は小さな凝集塊で生じたか、もしくは大まかに配置しており、そしてその細胞はこのとき膨大な混合突起を伸長させた。再度、ほとんど全ての細胞が、顕著なTuJ1免疫反応性を示した。短期培養におけるのと同様に、GFAP-免疫反応によって示されるグリアは、全培養細胞の5%を下回っていた。これらの発見は、一見純粋な集団のニューロン始原細胞を含むSVZaの領域が単離され得ることを実証した。

多くのタイプのニューロンが基質依存性突起成長を示すため、SVZa由来細胞が突起を伸長させる能力を異なる基質において試験した。SVZa細胞は、 $10 \mu\text{g/ml}$ の

ポリ-D-リジン上、およびポリ-L-オルニチン上(またはポリ-D-L-オルニチン上)で突起を伸長させることが分かり、単極、双極、および多極形態を示した。しかし、小脳顆粒ニューロンとは対照的に、 $10\mu\text{g/ml}$ ラミニン上では、SVZa細胞は発芽(sprout)しなかった。

培養SVZa細胞の他の予期されなかった特性は、それらが培養物中で増殖することである。これは、ニューロン特異的細胞マーカーを発現する多くの細胞は有糸分裂後細胞であるため(Moodyら、J. Comp. Neurol. 279:567(1989); MenezesおよびLuskin、J. Neurosci. 14:5399(1994))、驚くべきことであった。さらに、ニューロンを生じる細胞が培養物中で分裂し得る条件を確立することは、しばしば、特に本実施例におけるように低密度にてプレートした場合に困難である。(ReynoldsおよびWeiss、Science 255:1707(1992))。培養されたSVZa細胞は、プレティング直後に分裂しただけでなく、培養されてから数日後にも分裂した。

培養されたSVZa細胞が分裂することを実証するために、細胞増殖マーカープロモドオキシウリジン(BrdU)を培養培地に加え、次いで、1～24時間後に培養物を上記したように固定し、BrdUに対する抗体で染色して標識された細胞の存在を明らかにした。固定後、培養物を0.01M PBSで洗浄し、2N HClで60℃にて処理してDNAを断片化し、続いて、0.01Mホウ酸緩衝液(pH8.3)中で酸中和した。PBSでの徹底的な洗浄ならびにブロッキング血清(10%正常ヤギ血清および0.01% Triton X-100含有0.01M PBS)の適用後、培養物を、1:500希釈を用いてBrdUに対するモノクローナル抗体( $\alpha$ -BrdU、Accurate、NY)と4℃にて一晩インキュベートした。その後、培養物を、0.1M PBSでリンスし、1:200希釈でローダミン結合ヤギ抗ラット二次抗体(Jackson ImmunoResearch、PA)と室温にて1時間インキュベートし、0.1M PBS中で洗浄し、Vectashield(Vector、CA)を用いてカバーガラスをかけた。BrdU陽性細胞は、赤蛍光核を呈示する。

#### 実施例 4

SVZa細胞の同所性移植：同所性移植されたSVZa由来細胞の移動行動を調べるために、解離されたドナーラットSVZa細胞を、ラット宿主の新生児期のSVZaに移植した。実験の目的は、移植細胞が、未操作のSVZa由来細胞と同一の誘導合図(guid

ance cue) を読むことができるか、そして宿主の脳で、同一の層状分布を達成することができるかを決定することであった。組織の外植片よりも、むしろ解離されたSVZa細胞を移植し、移植細胞の宿主の脳への組み込みを促進した。

同所性移植されたSVZa細胞の移動行動を分析するために、移植後の3つの時期、すなわち、短期生存（1週間後またはそれ以内）、中期生存（2～3週間後）、および長期生存（4週間またはそれ以上）での移植細胞の分布を検査した。研究用に選択した様々な時点において、移植細胞の分布が未操作の細胞の分布と一致するかどうかを確認するために、実験を行った。PKH26をSVZa内に直接注入して、その細胞を標識する、本発明者らのインビボ研究から、分析用に選択される時期は、SVZa由来細胞が、経路、嗅球の上皮下帯、および重なる顆粒細胞層で優勢的に生じるとき、およびそれらが顆粒細胞および糸球体層における最終の位置にあるときと一致する。

#### 短期生存

未操作のSVZa由来細胞による細胞の運動の全体的な分布および動態を、移植されたSVZa細胞のそれと比較するために、解離されたPKH26標識SVZa細胞を宿主のSVZaに注入した。インビボでPKH26標識細胞を可視化するために、動物を、4%のパラホルムアルデヒドで灌流し、脳を取り出し、そしてビブラトームで切片化した。連続100 $\mu$ m切片を封入し、PKH26標識細胞について蛍光顕微鏡で検査した。その後の細胞の位置および形態を、移植後1週間以内に検査した。

移植1日後の宿主の脳の検査により、注入部位は通常SVZaに集められること、および通常高密度のPKH26標識細胞を含むことが明らかになった。注入部位では、赤色蛍光を発するPKH26標識細胞は小さく丸かった。これらの細胞は、通常個別の細胞として、または小さな凝集塊で生じ、新たに解離した細胞と類似していた。

移植されたSVZa細胞が示した移動の経路は、未操作のSVZa由来細胞がたどった経路と正確に一致する。それは、SVZaを嗅球の中心と連結する、数ミリメートルの長さを有する長い経路を構成する。移植後徐々に時間が経過するに従って、標識された細胞の分布は、移植の部位からさらに遠くに延びた。

移植後2日のうちに、連続する細胞の流れが、側脳室 (SVZa) の前角の吻側壁から経路の垂直肢 (vertical limb) にかけて観察された。移植後4日のうちに、標識された細胞は、経路の水平アーム (horizontal arm) 内にあり、いくつかの細胞は、嗅球の中心部に達した。移植後1週間が経過した時点では、移動する細胞が、SVZaから嗅球の中央まで延びる上衣下層全体に、均一に分布していることが確認された。さらに、未操作のSVZa由来細胞について確認されたように、移植細胞は、高細胞密度領域によって特徴付けられる、十分に区画された経路に厳密に限定されていた。これは、移植されたPKH26標識SVZa細胞が、移動経路の境界を正確に認知し、それから逸脱しないことを示す。

蛍光顕微鏡により、移植されたPKH26標識細胞の大部分が丸い細胞体を有すること、およびいくつかは嗅球に向かって延びる比較的短く厚い突起を有することが明らかになった。嗅球の上衣下帯内では、多くの移植細胞が、透明な非標識核を持つ、卵形または紡錘状の細胞体を有する。未操作のSVZa由来細胞とは対照に、この段階では、わずかな数の色素標識細胞しか突起を現さなかった。SVZa由来細胞

の差別的な標識を説明する1つの可能性は、PKH26はおそらく移植細胞を完全には標識しないということである。あるいは、いくつかの移植細胞は、完全に発達した突起を欠くのかかもしれない。この場合、移植細胞は、同様に嗅球にも移動している未操作のSVZa由来細胞の流れに取り込まれることによって、嗅球に達することができるのかかもしれない。

#### 中期生存

移植細胞の移動経路および嗅球の顆粒細胞層での分布。移植後2週間のうちに、移植細胞のいくつかは、嗅球の顆粒細胞層内に進んだ。標識された細胞が、嗅球の上衣下層から重なる顆粒細胞層内へと移動するかのように見えた。同時に、移動経路のより尾側の部分 (垂直肢) で、移植細胞の割合が顕著に低下した。移植後3週間のうちに、より多くの割合のドナー細胞が顆粒細胞層に入り、上衣下帯および嗅球に遠位の経路に残る細胞はより少なくなった。

移植細胞が、上衣下帯から顆粒細胞層に放射状に方向を変えたとき、それらの

いくつかは、2つのPKH26標識突起を示す顆粒細胞へと分化し始めた。顆粒細胞層内の移植細胞は、おそらく分化中であり、成熟している未操作の顆粒細胞に特徴的な双極性の形態を有していた。同所性移植の2～3週間後、PKH26標識細胞の中に見られる成熟した形態および未成熟な形態の範囲は、細胞が、分化の様々な段階にあることを示す。実際、顆粒細胞層のPKH26標識細胞のいくつかは、移動するニューロンに特徴的である、その紡錘状の細胞体 (cell soma) から判断して、まだ糸球体層への途上であると見られた。

いくつかの実験では、移植前にSVZa細胞を標識するために、BrdU取り込みを用いた。BrdU標識細胞を、MenezesおよびLuskin, J. Neurosci 14: 5399(1994)に記載される手順に従って可視化した。簡単に説明すると、脳を4%のパラホルムアルデヒドで灌流し、その後、20% スクロースを含む0.1M リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) で一晩凍結保護した。BrdUの存在について処理する前に、脳を、Tissue Tek O.C.T. Compoundに包埋し、クリオスタットで18～20 $\mu$ mに矢状に切片化し、そしてスライド上に置いた。切片を、0.01MのPBSで洗浄し、60℃で2N HClで処理して、DNAを断片化した後、0.01Mのホウ酸緩衝液pH8.3で酸中和した。PBSで完全

に洗浄し、ブロッキング血清 (10%正常ヤギ血清と0.01% Triton X-100とを含む0.01M PBS) を加えた後、切片を、1:500の希釈を用いて、BrdU ( $\alpha$ -BrdU, Accurate, NY) に対するモノクローナル抗体と4℃で一晩インキュベートした。この後、切片を、0.1M PBSですすぎ、1:200の希釈で、ロードミン結合ヤギ抗ラット二次抗体 (Jackson ImmunoResearch, PA) と室温で1時間インキュベートし、0.1M PBSで洗浄し、Vectashield (Vector, CA) を用いてカバーガラスで覆った。BrdU陽性細胞は、赤色蛍光核を示す。移植されたBrdU標識細胞の分布は、同一の生存期間後に検査した場合、PKH26標識細胞の分布と一致した。移植2週間後、蛍光顕微鏡により、強く標識されたBrdU陽性細胞は、重なる顆粒細胞層内へと進んでいたものも多少あったが、嗅球に近い移動経路の部分 (水平枝)、および嗅球の上衣下帯に優勢的に存在することが明らかになった。従って、BrdU標識は、移植細胞の正確な形態を示しはしないが、それらの位置を明確に示す。

### 長期生存

PKH26標識手順およびBrdU標識手順の双方を使用して、移植されたSVZa由来細胞を明確に確認した。特に、時間の経過に伴って、PKH26の色素の強度が低下し得るという懸念があった。従って、ほとんどの結論は、BrdU標識細胞の分析に基づいている。

これまでの研究で、レトロウイルスのSVZa内への注入から4週間後に、SVZa由来細胞は、最終の層状分布を達成するということが示された (Luskin, Neuron 11: 173(1993))。これらの実験では、移植細胞の類似する層状分布が確認された。中期間生存と比較すると、かなり多くの数の移植細胞が、顆粒細胞層の全体に分布していた。細胞の別の群、おそらくは糸球体周囲 (periglomerular) 細胞が糸球体を取り囲んでいるのが確認された。いくつかの移植細胞は、移植4週間後、まだ嗅球の上衣下層の吻側の半分を占めていた。従って、未操作のSVZa細胞の移動パターンにおける一連の変化は、同位置に移植された細胞と一致すると思われる。これは、それらが同一のセットの誘導合図を識別することができるということを示唆する。

定量分析により、移植後の糸球体層における標識された細胞と顆粒細胞層における標識された細胞との間の比率は、未操作の脳で起こるものと同一であるということが示された (Luskin, Neuron 11: 173, (1993))。移植細胞の75%が、最終的には顆粒細胞層の中か、あるいはその近くで確認され、残り25%は、嗅球の糸球体層で確認された。これらの研究結果は、総合的に、移植されたSVZa由来細胞は、宿主のSVZa由来の対応物と同一の移動ルートを採択することができるだけでなく、顆粒細胞と嗅球の糸球体層との間で同一の層状分布を得ることもできるということを示唆する。

### 実施例 5

SVZa細胞の、新生児小脳、胎児終脳の脳室帯、または脳室下帯前部に隣接する領域への異所性移植：新生児小脳の外部顆粒層への注射を行うために、中脳および後脳の上部の頭蓋を通して小さな切開が行われ得、そして標識SVZa細胞は、ハミルトン注射器を用いて髄膜直下の位置に注入され得る (GaoおよびHatten, Scie

nce 260:367(1993))。

胎児終脳の脳室帯に注射を行うために、Transplantation: Neural Transplantation-A Practical Approach、Oxford Univ. Press、Oxford(1992)においてDunn ettおよびBjorklundが記載している手順に従い得る。簡単に述べると、深麻酔下で妊娠雌親の腹壁が切開され得る。子宮角が露出され、そして各胎児は光ファイバーチューブを用いて透過的に照らされ得る。標識SVZa細胞を含むピペットは、子宮壁、羊膜腔および胎児頭蓋を通じて大脳皮質の上に横たわる脳室帯中に挿入され得る。

脳室下帯前部に隣接する領域に移植されたSVZa細胞の挙動および分布を調べるために、SVZa細胞を宿主のSVZaの後方または側方のいずれかにある位置に移植した。レトロウイルス注射は、注射がSVZa内であるときのみ標識細胞が嗅球内に到達してニューロンになることが示されている(Luskin、Neuron 11:173(1993)、LuskinおよびMcDermott、Glia 11:211(1994))。この実験で用いた4つの動物に関しては、非SVZa注射に続いて移動経路または嗅球内に標識細胞は見い出されず、SVZaは、SVZa由来細胞を嗅球に導くために、ある位置情報を提供することが確認された。

成熟した(>6週間)嗅球内での、未操作のSVZa由来細胞の表現型アイデンティティが分析されてきた。SVZa由来細胞の表現型は、その形態(PinchingおよびPowell、J. Cell Sci. 9:305、347、379(1971))およびそれらが含む神経伝達物質候補(BartolomeiおよびGreer、Neurosci. Abst. 19:125(1993))に従って分類され得る。Halaszら(Brain Res. 167:221(1979))は、多くの糸球体周囲細胞同様、本質的に全ての顆粒細胞がGABAを含むことを示している。糸球体周囲細胞はまた、ドパミンの合成における律速段階である(McLeanおよびShiple、J. Neurosci. 8:3658(1988))チロシンヒドロキシラーゼを発現することが知られている。さらに、Gallら(J. Comp. Neurol. 266:307(1987))およびKosakaら(Brain Res. 343:166(1985))は、それぞれ独自に、糸球体周囲細胞のサブセット内にGABAおよびTHが共に位置していることを示している。さらに、Celio(Neurosci. 35: 375(1990))、Halaszら(Neurosci. Letters 61:103(1985))、およびKosakaら(Brain Res

411:373(1987))が、本質的に全ての糸球体周囲細胞がカルビンジン (28KビタミンD依存性カルシウム結合タンパク質) に対して免疫反応性であることを報告しているため、カルビンジンの免疫反応性は、カルビンジンを発現する糸球体層内に位置する未操作のおよび移植されたBrdU標識SVZa細胞において決定され得る。さらに、小脳および大脳皮質内の異所性移植されたSVZa由来細胞により獲得された表現型および嗅球内の脳室帯およびEGL細胞により獲得された表現型が検査され得る。

#### 実施例 6

二重標識：上記したようなBrdU標識SVZa細胞のSVZaへの移植に続いて、20  $\mu$ mのクリオスタット切片に対して二重標識手順を用いて、BrdUおよび伝達物質候補またはそれらの合成酵素の存在を明らかにするために手順が工夫されている。0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.4)中4%パラホルムアルデヒドでの灌流の後、脳を取り出し、0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.4)中20~30%スクロースにおいて一晩平衡化し、その後クリオスタットで20  $\mu$ mの厚みで矢状または冠状に切断した。切片を0.1 M PBSで洗浄し、45~50℃で15分間、2N HClで処理し、続いて0.1 Mホウ酸緩衝液(pH 8.

3)で15分間リンスした。その後切片を30分間PBS中10%の正常ヤギ血清中でインキュベートし、次いで、抗BrdU(1:500、Accurate、NY)を含む一次抗体と、GABA(1:500、Sigma)、TH(1:1000、Eugene Tech、NJ)またはカルビンジン(Sigma、1:1000希釈)のいずれかに対する抗体との混合液中で一晩インキュベートした。翌日、切片を0.1 M PBS中でリンスし、そしてBrdU免疫反応性細胞を可視化するためのローダミンに結合されたヤギ抗ラットIgGを含む二次抗体と、神経伝達物質候補の1つを同定するためのFITC結合二次抗体との適切な混合液中で2時間インキュベートした。最後に、これらの切片を0.1 M PBS中でリンスし、カバーガラスで覆った。

標識SVZa細胞を同定するために切片を蛍光顕微鏡観察により検査し、それらの神経伝達物質表現型および層位置を決定した。SVZa標識細胞は、赤色蛍光により明らかであり、そして伝達物質の標識は同一の細胞内に存在する場合、未操作細

胞および移植細胞の両方の緑色蛍光によって明らかである。SVZa由来のGABA作動性およびTH免疫反応性細胞の割合を、嗅球の各層内の未操作細胞について決定した。

これまでの研究は、SVZa由来細胞が、その形態学的特徴および層分布に基づくニューロンであることを示している。嗅球内のSVZa由来ニューロンをさらに特徴づけるために、伝達物質表現型のための細胞タイプ特異的マーカーを用いた。P2におけるBrdUのSVZa注入に続いてSVZa由来細胞のほとんどが最終目的地に到達するP20において、BrdU標識細胞を免疫組織化学を用いて位置決めし、そしてこれらの神経伝達物質表現型を、 $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)およびドパミン合成酵素チロシンヒドロキシラーゼ(TH)に対する抗体を用いて評価した。一重および二重標識細胞の存在を検出するために同時間接免疫蛍光を用いて、SVZa由来細胞の10%が、糸球体層内においてBrdUとTHの両方に関して陽性であること、ならびに顆粒細胞層および糸球体層内のSVZa由来細胞のそれぞれ約67%および46%がGABA作動性(GABAおよびBrdU陽性)であることが判明した。P20で分析した場合、BrdUのP2注入から生じた糸球体周囲細胞の28%および12%が、それぞれTHおよびGABA陽性であることが判明した。同様に、P20において、顆粒細胞層内のGABA作動性ニューロンの11%がP2に生じた。これらの結果は、新生児SVZaが糸球体層に送られるドパミン作

動性細胞の供給源であり、また顆粒細胞および糸球体層に送られるGABA作動性細胞の供給源でもあることを示す。

嗅球内の未操作のSVZa由来細胞の伝達物質表現型を今、SVZaに移植後嗅球に到達する、同所性および異所性移植された細胞により発現される伝達物質表現型と比較し得る。このことは、移植された細胞が未操作のSVZa由来細胞と同じ伝達物質アイデンティティを獲得するか否か、または異所性移植された細胞により発現された伝達物質候補が、それらが通常発現する伝達物質よりも代表的であるか否かを決定することを可能にし得る。異所性移植された細胞が糸球体周囲層に到達しそしてTHを発現する場合、これらのアイデンティティは再特定されたという結論が導かれ得る。ドパミンは通常黒質および嗅球の細胞によってのみ発現される

。未操作細胞の表現型は、同所性および／または異所性移植された細胞、すなわち線条体に移植された細胞と比較され得る。

#### 実施例 7

皮質および小脳細胞の、新生児 SVZa への異所性移植：さらなる実験において、通常ラジアルグリアに沿って移動する新たに生じたニューロンが、ラジアルグリアに導かれていないように見える SVZa 由来細胞により付着される高度に制限された経路を進み得るか否かを調べた。小脳外部の顆粒層 (EGL) 細胞 (出生後) および脳室帯 (VZ) 細胞 (出生前) を移植のために収集した。簡単に述べると、EGL 細胞を、小脳表面を吸引することまたは顕微解剖により取り出し、その後トリプシンおよび DNase を用いて上述したような細胞を解離した。E16 VZ の始原細胞を収集するために、McConnell (Brain Res. Rev. 13:1(1988)) が用いた改変された手順を採用した。15～17 日のラット胎児の終脳の VZ からの解離された細胞、または生後 5 日目 (P5) または P6 の小脳の EGL からの解離された細胞を、細胞増殖マーカー BrdU または蛍光親油性色素 PKH26 のいずれかで標識し、P0～P2 のラットの SVZa に定位的に移植した。結果は、異所性移植された VZ 細胞は感染部位にとどまることを示した。対照的に、異所性移植された EGL 細胞は移動経路を行ったり来たりしたが、嗅球 (OB) の中央から離れる方向に移動するものはほとんどなかった。

#### 実施例 8

線条体への SVZa 細胞の異所性移植：移植のために得られる標識 SVZa 細胞の数を最大にするために、P0～P1 のドナー仔ラットに BrdU ストック溶液を 2～3 回腹腔内注射 (6 時間おきに) した (0.9% 生理食塩水中 0.007N NaOH の 1 ml あたり 5 mg BrdU、0.3 ml/仔ラット/注射)。最後の注射は、ドナー組織の切り出し 1 時間前に行った。

SVZa 細胞を上記のように解剖および解離し、細胞懸濁液の生存度を上記のように決定した。約 80～95% の生存度が得られ、細胞濃度は  $2.9 \times 10^4 \sim 5.4 \times 10^6$  細胞/ml の範囲であった。PKH26 色素および希釈液 C の  $4.0 \mu\text{M}$  溶液中で新しく調製された細胞懸濁液を 3～5 分間、Sigma により提供されたプロトコルに従ってインキュベートすることにより、解離された細胞を PKH26 で標識した。

解離されそして標識されたSVZa細胞を、低体温により麻酔されたP0～P2の仔ラットの線条体に移植した。注射座標の変動を減少させて一貫性を最大にするために、仔ラットの頭部をSyngardで輪郭づけられたモールド上に載置した。(P0～P2の線条体を標的する座標を決定するために、PKH26を4匹のP0～P1の仔ラットの脳に直接注射した。PKH26注射から得られた結果および標識SVZa細胞の移植を用いた2～3の初期移植実験から得られた結果を比較することにより、座標の範囲を選択した。) プレグマから0.8 mm前方と2.0 mm前方との間(A-P)、矢状洞から1.2 mm側方と2.3 mm側方との間(M-L)、および軟膜表面から深さ2.3 mmと深さ3.5 mmとの間(深さ)に注射を行った。本発明者らは、座標A-P、1.0～1.5 mm、M-L、1.8～2.3 mm、および深さ2.5～3.5 mmの範囲内の注射が線条体を標的する可能性が最も高く(表1)、Abrousら(1)によって用いられた範囲と一致することを示した。

頭蓋を露出させるために、矢状縫合の上部の皮膚を切開した。矢状縫合から側方1.8～2.3 mmでありプレグマの前方1.0～1.5 mmを中心として周りの頭蓋に小さい穴を開けた。マイクロマニピュレーターに取り付けられた、SVZa細胞を含む $10 \mu\text{l}$ ハミルトン注射器を、軟膜表面から約2.5～3.5 mm降ろし、2～4  $\mu\text{l}$ の標識細胞懸濁液を線条体に注入した。移植に続いて、上部の皮膚を元の位置に戻して外科用糊で密封し、仔ラットをホームケージに戻す前に回復のためにヒートラ

ンプ下に置いた。移植に続いて、仔ラットを様々な期間生存させた後灌流した。灌流時、仔ラットをエーテルで麻酔して、0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.4)中の4%パラホルムアルデヒドで心臓を介して灌流した。脳を取り出し、矢状平面にブロック化し、少なくとも1時間同一の固定液中で後固定した後、0.1 M PBSで洗浄した。BrdUおよびPKH26標識細胞を上述のように検出した。

表1: SVZa細胞の移植のための座標およびそれらの後の分布

ラット#	移植時 年齢	生存 (日)	注入部位 (mm) M-L			深さ	注入量 ( $\mu$ L)	PKH26 または BrdU	標識細胞 線条体中/線条体の 境界沿い
A. 短期生存									
1	P1	3	0.9	1.8	3.1	4	BrdU	+/-	
2	P1	5	0.8	1.7	2.4	3	PKH26	-/-	
3	P1	2	0.7	2.0	3.1	3	BrdU	+/-	
4	P1	2	1.1	2.0	3.2	3	BrdU	+/-	
5	P1	2	1.0	2.2	3.2	3	BrdU	+/-	
6	P1	2	1.0	2.3	3.3	3	BrdU	+/-	
7	P1	2	0.8	2.0	3.2	3	BrdU	+/-	
8	P1	2	1.0	2.0	3.2	3	BrdU	+/-	
B. 長期生存									
I. 線状体に制限されたSVZ a細胞									
1	P0	13	1.5	2.0	2.9	4	PKH26		
2	P1	26	1.0	2.0	3.2	4	PKH26		
3	P1	26	1.0	2.0	2.9	4	BrdU		
4	P1	26	0.8	1.2	3.3	4	BrdU		
II. 線状体の境界に制限されたSVZ a細胞									
5	P1	13	2.0	1.7	2.3	2	PKH26		
6	P0	20	1.2	2.0	2.5	2	PKH26		
7	P1	28	1.2	1.5	3.3	3	BrdU		
III. 線状体内および線状体の境界沿いのSVZ a細胞									
8	P2	13	1.0	2.0	3.3	3	BrdU		
9	P1	18	1.2	2.0	3.3	4	BrdU		
10	P0	26	1.0	2.0	3.0	4	PKH26		
11	P1	26	1.0	2.0	3.0	4	PKH26		
12	P1	41	1.2	2.0	3.4	4	BrdU		
IV. 脳の他の場所に存在するSVZ a細胞									
13	P2	13	1.0	2.0	3.2	3	BrdU		
14	P2	13	1.0	2.0	3.2	3	BrdU		
15	P1	19	1.0	1.7	2.5	4	PKH26		
16	P1	20	2.0	1.5	3.1	4	PKH26		
17	P1	21	1.8	1.2	3.2	4	PKH26		

新生仔ラットの脳に、標識SVZa細胞の線条体への移植を施した。続く移植されたSVZa細胞の分布を灌流時（生存）にマッピングした。P0～P2の仔ラットにPKH26またはBrdU標識されたP0～P2のSVZa細胞で移植した。頭部をSylgardモールド内に載置して、全ての移植片を右半球に載置した。注射部位座標の参照点は以下の通りであった：前後（A-P）寸法に関してはブレグマに対して前方に測定された距離、内外（M-L）寸法に関しては矢上洞に対して外側の距離、および深さに関しては軟膜表面下の距離。線条体内のまたは線条体境界に沿った標的細胞の存在または不在をそれぞれ(+)または(-)とスコアした。計25の脳を調べた。脳を

、短期生存（2～5日、n=8）および長期生存（>13日、n=17）に群分けした。長期生存群の17の脳のうち、12の脳を詳細な分析のために用いた。残りの5つの脳においては、移植片は線条体表面に置かれており、更なる考慮から除外した。SVZa細胞の分布は(1)注射された細胞懸濁液の量、(2)移植時の宿主の年齢、または(3)移植後の生存時間のいずれにも関連しないことに留意されたい。また、側方皮質流(lateral cortical stream)に沿った移植された細胞の存在は、いずれの特定の座標セットとも関連しない。

#### 注射部位での細胞の外観

SVZa細胞をP1線条体中に移植した3日後、BrdU標識したSVZa細胞は、線条体の中央において容易に同定され、そしていくつかの場合にはまた、脳梁を貫通する注射路に沿って同定された。注射路に沿った標識細胞の存在は、おそらく、細胞懸濁物の逆流に起因するか、またはHamilton注射器の挿入もしくは引抜きの際の標識細胞の少量の漏出のためである。この結果は、移植直後の標識細胞の核の完全かつ強度の染色を示す。多くのBrdU標識細胞は、血管付近に凝集した。さらに、いくつかの細胞は線条体内でさらに分散し、そして明らかに移動したが、細胞は通常、この短期の生存時間で、互いに隣接して見られた。

#### 宿主線条体におけるドナーSVZa細胞の移動パターン

P0-P2間で作製した操作していないSVZa細胞は、嗅球の中央における上衣下層へ数ミリメートル移動する。4週間後までに、これらは、顆粒細胞または糸球体層におけるそれらの最終的な位置に到達する。従って、宿主線条体における標識SVZa細胞の分布を、SVZa細胞がそれらの注射部位から分散したか否かを調査するために移植後2～4週間で試験した（長期生存、n=17、表1）。本発明者らは、本発明者らの分析を、注射した17個の脳のうちの12個に限定した。この12個の脳では、SVZa移植物は線条体内に位置した。残りの5個の脳は、さらなる考察から排除した。なぜなら、本発明者らは、SVZa細胞が、脳内に充分深く移植されていないと結論したからである。これらの脳における移植された細胞は、脳室下帯において、または線条体を覆う脳室に対して背側の脳梁において見出された。

本発明者らは、移植されたSVZa細胞の3つの分布パターンを観察し、従って、

12個の脳からの結果をそれに応じてグループ分けした：1)標識された細胞が、線条体に限られた場合；2)標識された細胞が、線条体と脳梁との間の線条体境界に沿って位置した場合；および3)標識された細胞が、上記の位置の両方に存在した場合（表1）。本発明者らは、SVZa細胞の分布が移植後生存時間とも、移植時の宿主の年齢とも関連しなかったことを観察した。この研究のすばらしい発見は、注射部位を、研究したいずれの場合においても移植2～4週間後に区別し得なかったこと；グリオーシスが移植物の周囲に観察されなかったことであった。さらに、SVZa細胞は線条体境界に沿って見られたが、これらが線条体境界を横切ることはなく、そして周囲の脳皮質内に移動する。

線条体に制限されたSVZa細胞の外観および分布。

標識されたSVZa細胞は、分析した12頭の動物のうちの4頭の線条体において同定された（表1）。各々の脳において、線条体内のSVZa細胞は、個々の細胞として生じたか、または通常2～4細胞以下の小群で生じた。大きな、密に詰め込まれた細胞凝集物は、移植後2～4週間は観察されることはなかった。このことは、細胞がお互いから移動して離れたことを示す。標識した細胞は、しばしば、血管に極めて近接して見出された。標識された細胞は線条体を通して存在したが、分析した脳の大多数において、標識したSVZa細胞は、線条体の側縁よりも側脳室の近くに位置した。

PKH26で標識した移植細胞のうち、2～4細胞の小塊が、線条体内に突起を伸

長していることが見られた。移植後2～4週間の線条体内に位置したBrdU標識SVZa細胞は、移植後3日で試験した細胞ほど強度に染色されなかった。これは、SVZa細胞が、線条体内への移植後に細胞分裂を行なったことを示唆した。本発明者らの観察は、異所に移植されたSVZa細胞が、同時に分裂および移動するそれらの能力を保持したことを示す。

細胞が線条体内に移植された他の研究とは異なり、移植物に関連するグリア細胞は減多に見られなかった。グリア細胞の存在は、宿主線条体が移植手順により生じた局所的な外傷に反応している徴候であり、SVZa移植物においては存在せず、そして使用したドナーおよび宿主動物の年齢がより若いことに起因し得た。グリ

アバリアが存在しないことは、部分的に、線条体内の移植SVZa細胞の分散を担い得る。SVZa細胞が宿主組織による免疫拒絶を誘発しなかったことの可能性のある理由は、移植に用いられたSVZa細胞が、実質的に同質なニューロン始原細胞の集団であったからであり得る。ニューロンは抗原提示能を有さず、従って、免疫応答を開始することができない。グリア細胞は、拒絶過程における初期標的であり、移植されたSVZa細胞懸濁物には一般に存在しない。

線条体境界に制限されたSVZa細胞の外観および分布。

同様の座標が全ての動物における移植について用いられたが、移植SVZa細胞の分布は変化した。移植後、いくつか（12のうちの3）の場合、PKH26標識細胞またはBrdU標識細胞は、脳梁に隣接する線条体境界に沿ってのみ同定され、そして線条体自体の中には同定されなかった（表1）。標識されたSVZa細胞は、移植後2～4週間で線条体境界の背面、側面、腹側外側面に沿って存在した。標識細胞による線条体の外形の輪郭により、単に注射の結果として線条体の境界に配置されたのではなく、SVZa細胞が移動によりそれらの位置に到達したことが示唆される。様々な強度のBrdU染色が、標識SVZa細胞内で観察された。これは、個々または小群のいずれかで観察された。線条体境界に沿って見られたPKH26標識細胞は、何らかの顕著な形態学的特徴を有するようではなかった；これらは、しばしば他の個々の細胞に類似する突起を全く有さず、円形であった。これは、線条体の境界で細胞が、それらが線条体内に位置する場合に行うような、分化を行わないか

もしれないことを示す。

線条体内および線条体境界に沿ったSVZa細胞の外観および分布。

12頭の動物のうちの5頭において、標識した細胞が、移植後2～4週間で線条体内および線条体境界に沿っての両方で見られた（表1）。また、種々の強度のBrdU染色が、標識された細胞内で観察された。大多数の場合、線条体内に位置したSVZa細胞は、線条体境界に極めて近接して存在し、そして標識したSVZa細胞は、すべて先述のように線条体と脳梁との間の線条体縁に沿って分布した。

移植SVZa細胞と側皮質の流れとの関係。

重要なことは、12頭の動物のうちの8頭（67%）において、SVZa細胞が線条体境界に沿って存在したという事実である。線条体境界に沿ったこの領域は、Baye rおよびAltman, Neocortical Development, New York: Raven Press, Ltd., 116 ~127頁（1991）により記載された側皮質の移動の流れに対応する。これは、胎児期に存在し、そして側皮質板および腹側側皮質板に到達するように、発達する皮質の脳室帯由来細胞により使用される。この湾曲した経路に沿って分布する移植されたSVZa細胞の存在は、SVZa細胞が他の移動している細胞により使用される誘導信号を解釈し得ることを示唆する。

移植された新生児の脳室下帯始原細胞の短期生存。

成体ラットの線条体内へ定位に移植された、解離したBrdU標識SVZa細胞の短期の挙動および表現型を試験した。移植の3日後、ほとんどのSVZa細胞は、TuJ1に対して免疫反応性であった。TuJ1は、ニューロン特異的なクラスIIIの $\beta$ -チューブリンを認識する抗体である。成体線条体においては、移植されたSVZa細胞のみがTuJ1について強度に染色された。移植3日後、TuJ1（+）細胞はまた、50~250 $\mu$ mの移植物内で同定された。このことは、これらの細胞が、これらの移植部位から移動したことを示唆する。2週間以内に、移植した細胞は600 $\mu$ mまで分散した。非常に少数の移植細胞はGFAP（+）であった。しかし、移植物は、多数のGABA（+）細胞を含有した。移植細胞のいくつかは、移植の最初の2週間以内で、

抗体染色により決定した場合、チロシンヒドロキシラーゼ陽性であった。従って、SVZa細胞は、成体線条体内への移植後、分散してニューロンに分化する能力を有する。

#### 実施例9

ニューロン始原細胞のトランスフェクション：細胞を、SVZaから採集し、解離し、そして16ウェルチャンバースライド内の1%ペニシリン/ストレプトマイシンおよび10%ウシ胎児血清を有するHamのF10培地にプレートした。1ウェルあたり $3 \times 10^4$ と $8 \times 10^4$ 細胞との間の細胞を添加した。翌日または数時間後のいずれかに、細胞を、種々の量（30 $\mu$ l~200 $\mu$ l）のレトロウイルス（細胞質内に $\beta$ galを発現するBAG（ $1.04 \times 10^6$ 粒子/ml）、または核内に $\beta$ galを発現するnls-lacZレ

トロウイルスベクター [Gary Nolan博士の贈与物; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6795-6799(1987)] ( $1.54 \times 10^6$  粒子/ml) のいずれか) で感染させ、そして  $0.6 \mu\text{l}$ /ウェルの  $1 \text{ mg/ml}$  のポリブレン溶液を添加した。1日後、細胞を、2%パラホルムアルデヒド、0.4%グルタルアルデヒド、0.1M PBSで固定した。X-Galインキュベーション混合物 (Luskin, Neuron 11: 173(1993)) を添加し、そして各ディッシュにおける青色細胞/全細胞の数を決定した。4%までの細胞が青色であった。このことは、これらがトランスフェクトされたことまたはトランスフェクトされた遺伝子を受け継いだことを示す。

#### 実施例 10

SVZaからの不死化クローン細胞株の生成：一次培養物を、新生ラットからの解離SVZaから低密度で作製し得る。これらの培養物を次に、温度感受性SV40ラージTおよびneo<sup>r</sup> 遺伝子の両方を含むレトロウイルスでトランスフェクトし得る。感染後、レトロウイルスが組み込まれ、それゆえネオマイシン耐性を獲得した細胞を選択するために、G418 (ネオマイシンアナログ) を増殖培地に添加し得る。ディッシュ上にコロニーが形成されるまで、G418選択を維持し得る。これらのコロニーが形成した後、各コロニーを単離し、そして個別のディッシュで増殖させて、望ましくは単一の感染一次細胞の有糸分裂クローンからなる継代株(subline)を

生産し得る。

サザン分析を用いて、各継代株のクローン性を立証または反証し得る。不死化ラージT抗原の発現に影響し得る、レトロウイルス組み込みのランダムな性質に起因する、クローン細胞株を樹立することが重要である。SV40ラージT抗原cDNAを用いて、各細胞株から単離されたゲノムDNAの、いくつかの異なる制限切断物をプローブし得る。これにより、組み込まれた構築物の長さ、組み込み部位の数、および各株間のクローン関係について、各継代株を分析することが可能となる。

同時に、各継代株を培養で増殖させて、インビトロでの継代能力を例証し得る。十分な細胞が入手でき次第、その不死化寿命の初期の試料を保存するために、各継代株を冷凍し得る。

SVZaから細胞を得るために、低体温によって麻酔した新生(P0)のSprague-Dawley仔ラットを断頭し得、そして脳を氷冷 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ を含まないHBBS中へと切り取り得る。髄膜を除去した後、脳室下帯前部を顕微鏡下で解剖し得る(図1)。この組織を次にEagle's Basal培地中の0.15%トリプシン中で20分間インキュベートし得る。このインキュベートの後、組織を先端熱加工したパスツールピペットでの吸引に供して、単一細胞懸濁液を生成し得る。次に細胞を、10%ウシ胎児血清および1%のペニシリン/ストレプトマイシンを補充した1:1のDMEM:HAMS培地中、低密度で、いくつかのポリ-D-リジン被覆された35mmプラスチック培養ディッシュ上に播種し得る。細胞を39℃で24時間増殖させ得る。

一次SVZa培養物の播種の24時間後、細胞を33℃に移動し得、そして培地を、tsSV40ラージT抗原をコードする複製不能レトロウィルスを含むプロデューサー細胞株からの上清で置き換え得る。レトロウィルスの細胞内への侵入を促進するため、 $8\mu\text{g/ml}$ のポリブレンもまた培養物に添加し得る。4時間後、レトロウィルス上清を新鮮なDMEM/HAMS培地で置き換え得、そして細胞を33℃で保持し得る。次の日、 $0.5\text{mg/ml}$ のG418(ネオマイシンアナログ)を、ネオマイシン耐性細胞を選択するために培養物に添加し得る。この選択培地を3~5日ごとに換え得る。ディッシュ上にコロニーが形成されたら、それらを、クローニングリングで単離し得、そして24ウェルプレートの別々のウェルに移し得る。次に各継代株を増殖および継代して、研究のための細胞を提供し得る。各株のサブセットをまた、培地中の10% DMSO中で冷凍し得る。

高分子量ゲノムDNAは、以前に記載されたように(Maniatisら、Molecular Cloning(A Laboratory Manual)、Cold Spring Harbor、Cold Spring Laboratories、1982)各細胞株から調製され得る。 $10\mu\text{g}$ のDNAを、別々の反応で、XbaI、EcoRI、およびBgIIIで切断し得る。XbaIはレトロウィルス挿入物の両端を切断し、他方、EcoRIおよびBgIIIの両方は、構築物内を1回だけ切断する。次に、1975年にSouthernによって記載されたように、DNAを、0.8%アガロースゲル上で、既知サイズのDNAマーカーの側でサイズ分画し得、そしてナイロンフィルター(GeneScreen Plus、Dupont)上に移し得る。次にフィルターに結合したDNAは、ストリンジェ

ントな条件下で、ランダムプライムドSV40ラージT抗原プロープにハイブリダイズし得る。

本出願を通して、種々の刊行物が言及される。これらの刊行物の開示は、本発明が関連する技術の水準をより詳細に説明するために、その全体が本出願に参考として援用される。

本発明の方法は、本発明の特定の実施態様の特定の詳細に関して記載されているが、このような詳細は、それらが添付の請求の範囲に含められるという範囲としておよびその範囲までとして見なされる場合を除き、それらが本発明の範囲を制限するものと見なされるべきことを意図しない。

【図1】

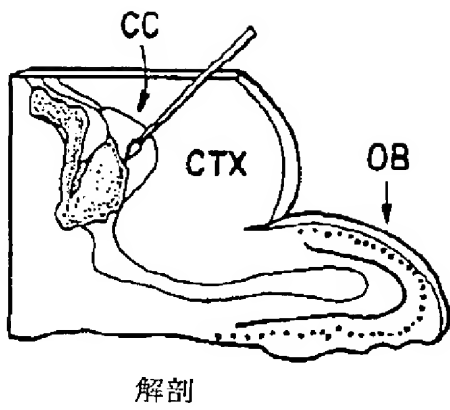


FIG. 1A



FIG. 1B



FIG. 1C

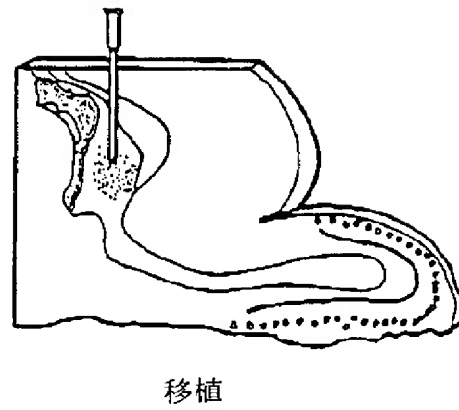


FIG. 1D

【図2】

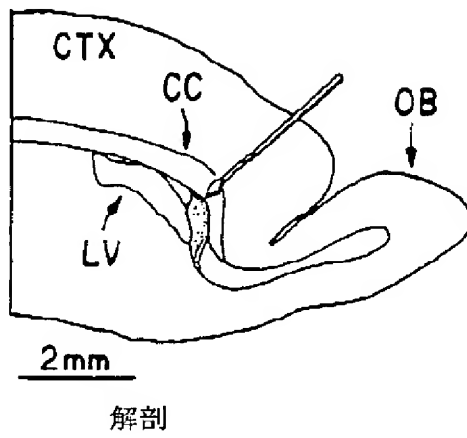


FIG. 2A



FIG. 2B

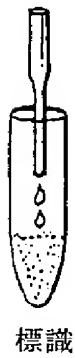


FIG. 2C

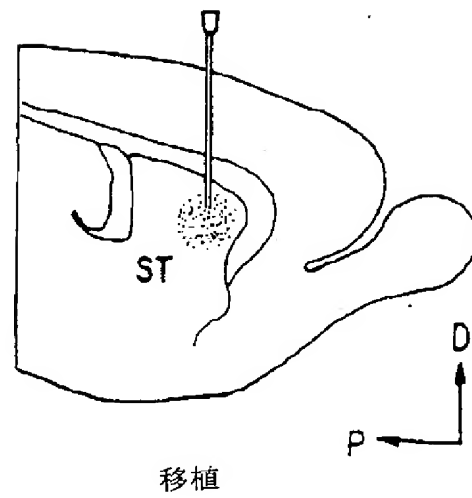


FIG. 2D

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US96/11304

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) : A61K 48/00; C12N 5/00; C12Q 1/02, 1/68 US CL : 435/6, 29, 240.1; 424/93.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 29, 240.1; 424/93.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, CHEMICAL ABSTRACTS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	REYNOLDS, B. A. et al. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. Science. 27 March 1992, Vol. 255, pages 1707-1710, especially page 1708.	1-9, 20 and 21
Y	US 5,082,670 A (F. GAGE ET AL) 21 January 1992, column 2, line 32 to column 3, line 25 and column 23, line 30 to column 26, line 3.	10-17
Y	VAYSSE, P. J.-J. et al. A Clonal Analysis of Glial Lineages in Neonatal Forebrain Development In Vitro. Neuron. September 1990, Vol. 5, pages 227-235, especially page 228 and 229.	18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 SEPTEMBER 1996		Date of mailing of the international search report 0 2 OCT 1996
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer DEBORAH CROUCH Telephone No. (703) 308-0196

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 33/53

C 1 2 N 5/00

E

/(C 1 2 N 15/09

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 N 5/06

C 1 2 R 1:91)